



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 196 23 916 A 1

⑯ Int. Cl. 6:
C 07 J 9/00
A 61 K 31/575
A 61 K 51/12

⑯ Anmelder:
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin,
13125 Berlin, DE

⑯ Zusatz zu: P 44 46 937.3

⑯ Erfinder:
Reszka, Regina, Dr., 16341 Schwanebeck, DE

⑯ Neues Cholesterolderivat für den liposomalen Gentransfer
⑯ Die Erfindung betrifft ein neues Cholesterolderivat für den liposomalen Gentransfer. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die Gentechnik.
Das neue Cholesterolderivat 3β [N-(N,N'-Dimethylaminoethoxy)-carbamoyl]cholesterol (DAC-Chol) wird durch Umsetzung von N,N'-Dimethylethylendiamin und Chlorformylcholesterol in äquimolaren Mengen hergestellt und durch Chromatographie gereinigt.
DAC-Chol ist nicht toxisch und kann vorteilhaft für den direkten liposomalen Gentransfer eingesetzt werden.
Gegenstand der Erfindung ist ferner eine neue Methode des direkten liposomalen Gentransfers *in vivo*, die dadurch gekennzeichnet ist, daß Liposomen/DNA-Komplexe kontinuierlich bzw. in gezielten Zeitintervallen über automatische oder nachfüllbare Pumpsysteme wiederholt appliziert werden.

DE 196 23 916 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 10. 97 702 050/425

7/24

DE 196 23 916 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein neues Cholesterolderivat für den liposomalen Gentransfer sowie ein Verfahren zu seiner Herstellung. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die Gentechnik.

5 Kationische Liposomen sind effektive nichtvirale Transfektionsreagentien für tierische Zellen *in vitro* (P. Felgner, G. Ringold, *Nature* 337/1989, 387–388). Das erste Reagenz dieser Art, DOTMA (N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid), ist nach Mischung mit einer äquimolaren Menge von DOPE (Dioleylphosphatidylethanolamin) in der Lage, eine Reihe von Säugerzellen *in vitro* und *in vivo* zu transfizieren.

10 Die Synthese von DOTMA verläuft über viele Stufen mit einer verhältnismäßig geringen Ausbeute. Das handelsübliche Mittel, Lipofektin, welches DOTMA und DOPE enthält, ist darüber hinaus relativ teuer. Andere kationische Liposomreagentien mit kommerziell zugänglichen kationischen Amphiphilen haben sich als relativ toxisch gegenüber den behandelten Zellen erwiesen (Pinnaduwage et al, *Biochim. Biophys. Acta* 285/1989, 33–37).

15 X. Gao und L. Huang (*Biochem. Biophys. Res. Comm.* 179/1991, 280–285) haben das kationische Cholesterolderivat 3β(N-(N',N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl)cholesterol (DC-Chol) beschrieben. Es kann in einer Stufe hergestellt werden, Liposomen mit diesem Lipid transfizieren effizienter und sind weniger toxisch gegenüber den behandelten Zellen als das Lipofektin-Reagenz.

20 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein neues kationisches Lipid zu finden, das bei mit DC-Chol vergleichbarer Transfektionsfähigkeit eine geringere Toxizität aufweist und damit insbesondere für eine *in vivo*-Anwendung geeignet ist.

25 Die Aufgabe wird gemäß den Ansprüchen 1 und 2 gelöst, das Herstellungsverfahren ist in Abb. 1 formelmäßig dargestellt.

Das neue Mittel unter Einsatz von DAC-Chol hat gegenüber den bisher verwendeten Mitteln den Vorteil, bei hochsensiblen Zellen nicht toxisch zu sein und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu erfolgreichen Transfektionen zu führen. Die Anwendung des Mittels wird an Glioblastoma-Zellen der Ratte, die sonst nur mit geringer Effektivität transfiziert werden können, gezeigt. Es werden Transfektionsraten erreicht, die im Vergleich zur Calciumphosphat-Präzipitationstechnik (CPPT) bis zu 10fach höher sind. Dieser Befund dürfte auf eine kompaktere Formation der DNA, einen besseren Liposom-Zellkontakt über die positiven Ladungen der Vesikel und auf die höhere Stabilität in Hinsicht auf die DNA abbauenden Enzyme zurückzuführen sein.

30 Dadurch kann es vorteilhaft für den direkten liposomalen Gentransfer gemäß Anspruch 5 eingesetzt werden. So lassen sich z. B. auch Immunliposomen durch Kopplung von Organ- bzw. gewebespezifischen Antikörpern unter Zusatz von DAC-Chol/DOPE herstellen. Bei vorheriger Inkubation der zu transfizierenden DNA mit Kernproteinen (z. B. HMG-1) lässt sich eine erhöhte Integration und Expression des Fremdgens nach Verkapselung bzw. Assoziation in DAC-Chol/DOPE-Liposomen erreichen. Eine weitere Erhöhung der Aufnahme (Fusion) der DAC-Chol-Liposomen ist möglich, wenn man Fusionsproteine bzw. inaktivierte Viren in die Liposomenmembran rekonstituiert bzw. assoziiert.

35 Von Vorteil ist ferner, daß man diese Liposomen ohne nennenswerte Toxizitäten bzw. Immunreaktionen gemäß Anspruch 5 über automatische oder nachfüllbare Pumpsysteme zum direkten *in vivo*-Gentransfer (intratumoral bzw. organ-spezifisch) verabreichen kann. Mit dieser Methode, die auch für andere Liposomen anwendbar ist, wird eine im Vergleich zu retroviralen bzw. adenoviralen *in vivo*-Methoden eine weit höhere Transfektionseffektivität erreicht. Damit können Tumorzellen, die sich in unterschiedlichem Maße zu einem bestimmten Zeitpunkt in Proliferation befinden, transfiziert und abgetötet werden.

40 Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

45 Ausführungsbeispiele

1. Herstellung von 3β(N-(N,N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl)-cholesterol (DAC-Chol)

50 Die symmetrische Form von Dimethylethylendiamin wird nach der Vorschrift von Gao et al (*Biochem. Biophys. Res. Comm.* 179; 280) mit Chlorformylcholesterol umgesetzt. Das erhaltene ölige Produkt wird einer Säulenchromatographie (Silicagel 60, Laufmittel Trichlormethan/Methanol = 9 : 1) unterworfen. Das abgetrennte DAC-Chol besitzt nach der dünnenschichtchromatografischen Reinigung (Laufmittel: Trichlormethan/Nethanol = 65 : 35) einen Rf-Wert von 0,53–0,57.

55 Für die weitere Verwendung wird DAC-Chol mit DOPE im Verhältnis 3 : 2 gemischt.

2. Marker- und TNF-alpha-Gentransfer mit kationischen Liposomen in Vergleich zur Calciumphosphat-Präzipitationstechnik (CPPT) *in vitro*

60 Der Marker-Gentransfer führt zu einer vierfach höheren Transfektionsrate für kationische Liposomen als mit der CPPT-Methode. Die humanen Zelllinien N64 und N31 zeigen beim Vergleich mit den üblichen Transfektionsmethoden (CPPT) eine 4–10fach höhere Transfektionsrate bei Verwendung von DAC-Chol/DOPE-Liposomen. Beim Einsatz von F98 Glioblastoma-Zellen von Ratten werden jedoch nur geringe Unterschiede beobachtet. Interessanterweise ist die Präparation gemäß der Erfindung trotz des aus dem DNA-Anteil resultierenden hohen Gehaltes an DAC-Chol/DOPE-Liposomen nicht toxisch, was sowohl anhand von Vitalitätstesten (MTT) als auch an morphologischen Parametern nachgewiesen werden kann.

Tabelle 1

Maximale Transfektionseffizienz (aus 3 Experimenten, in % der transfizierten Zellen (5×10^5 , 5 µg DNA (pBAG))

Transfektionsmethode	N31-Zellen	N64-Zellen	F98-Zellen
DC-Chol	1.26	2.00	1.06
Lipofectin	0.40	1.10	2.05
Ca ₃ (PO ₄) ₂	0.12	0.52	0.76

Tabelle 2

hTNF Expression nach Gentransfer von F98 Zellen

Transfektionsmethoden	TNF Aktivität ng/ml von 5×10^4 Zellen, 24h
Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,81 ± 0,29
DAC/Chol/DOPE	1,76 ± 0,3
Lipofectin	1,76 ± 0,29

Die Resultate sind ein Mittel aus 4 Experimenten + Standardabweichung. Der t-Test für unabhängige Proben zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen der 3 Techniken.

Die hTNF-Sekretion nach dem Transfer mit den verschiedenen Methoden liegt zwischen 1–2 ng/ml. Die ausgeschiedene TNF-alpha Menge bewirkt eine deutliche Wachstumshemmung von F98-Zellen innerhalb von 5 Tagen. Die Wachstumshemmung wird von morphologischen Änderungen und vom Zelltod begleitet. F98-Zellen, die mit dem leeren (pWG29del3-)Vektor transfiziert wurden, exprimierten keine nachweisbaren Mengen von TNF und erwiesen sich als morphologisch intakt.

3. Die Stimulierung der TNF-alpha Expression von DAC-Chol-Liposomen durch Dexamethason

Tabelle 3

Dexamethason-stimulierte Expression von hTNF in transfizierten Zellen

	Nr. des Zellklons	TNF Aktivität ng/ml $5 \times 10^5/24 \text{ h}$	x fach
	Dexamethason ($10^{-6} \text{M}/5 \text{h}$)		
5			
10			
15	Lipofectin	10 - 2.03 + 17.89	8.9
20	DAC-Chol/DOPE	5 - 1.12 + 19.78	17.6
25	Transfectam	8 - 2.93 + 15.34	5.3

30 Dexamethason kann die hTNF-Produktion in F98 Zellklonen, gewonnen nach Transfektion mit DAC-Chol-Li-
posomen, bis zum 18fachen steigern. Ausgehend von den vorhergehenden Ergebnissen werden kationische
DAC-Chol-Liposomen für den *in vivo*-Marker Gentransfer ausgewählt.

4. LacZ Gentransfer mit DAC-Chol/DOPE Liposomen *in vivo*

35 Nach dem *in vivo*-Marker Gentransfer mittels DAC-Chol-Liposomen in implantierte Rattentumore (F98, 6 µg
LacZ/10 µl DAC-Chol/DOPE) konnte nachgewiesen werden, daß diese Liposomen beim direkten Gentransfer
in der Lage waren, bis zu 3 Zellschichten um die Injektionsebene herum zu transfizieren (gemessen an einer
positiven X-Gal-Färbung). In normalem Hirngewebe konnte dagegen keine Färbung durch endogene β-Galac-
tosidase nachgewiesen werden.

40 5. *In vivo* Gentransfer mit DAC-Chol/DOPE Liposomen nach Pumpapplikation

45 Das in Chloroform gelöste kationische Cholesterolderivat (DAC-Chol, 304 µg) wird mit der chloroformischen
Lösung des Helferlipids Dioleylphosphatidylethanolamin (DOPE, 195,5 µg), in unterschiedlichen molaren Ver-
hältnissen gemischt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Den dabei entstandenen Lipidfilm,
der unter N₂-Strom zur vollständigen Entfernung des Chloroforms 2 Stunden nachgetrocknet wird, hydratisiert
man anschließend mit 500 µl 20 mM PBS-Puffer pH 7,4 bzw. serumfreiem Medium, in dem sich 100 µg eines
Markergens [z. B. pUT 651 (β-Gal-Gen Vector) oder pUT 650 (Luciferase-Gen-Vektor)] bzw. eines Therapie-
Markergens [z. B. pUT 649 Thymidikinase-Gen-Vektor, (Suicidogenvektor), Zyzokingen-Vektoren] befindet. Die Suspen-
sion wird kurzzeitig beschallt (Badbeschall), um eine Partikelgröße von 100–120 nm zu erreichen.

50 Dieser Liposomen/DNA-Komplex ist über einen Zeitraum von mindestens 3 Tagen bei 37°C biologisch aktiv
(gemessen an der Transfereffizienz des Markerogens) und stabil, d. h. er zeigt während dieser Periode keinerlei
Präzipitationsneigung.

55 Im Anschluß an die Präparation des Liposomen/DNA-Komplexes wird dieser entweder über ein kontinuierli-
ches Applikationssystem (z. B. Pumpapplikation) oder durch wiederholte Einzelgaben über Kathetersysteme,
mit/ bzw. ohne Reservoir oder unterbrechbaren Pump- bzw. Infusionssystemen *in vivo* verabreicht (z. B. stereot-
aktische Implantation eines Kathetersystems in einen Hirntumor bzw. die Tumorthöhle).

6. *In vitro* und *in vivo* Transfer von Oligonukleotiden

60 Die Lipidfilmherstellung erfolgt wie in Bsp. 5 beschrieben. Im entsprechenden Puffer oder serumfreien
Medium werden dem Lipidfilm bzw. den präformierten Liposomen (5 µM) 0,5 µM Oligonukleotide (hCD44/Sen-
se und Antisense; 21 Basenpaare, hCD6/Sense und Antisense) zugesetzt. In Abhängigkeit von der biologischen
65 Stabilität der Komplexe lassen sich diese z. B. *in vitro* 4 h mit CD44 exprimierenden Glioblastomzellen (U373)
inkubieren. Dies führt zur 98%igen Blockade der DC44 Expression (Abb. 2–4). Für die *in vivo* Anwendung sind
die im Bsp. 5 ausgeführten Applikationsarten anwendbar.

7. Herstellung von Liposomen mit rekonstituierten Fusionsproteinen zum Gen- und Oligonukleotidtransfer

10 mg F und/oder HN-Protein des Sendai Virus oder die Fusionsproteine anderer Viren bzw. artifiziell hergestellte Proteine werden mit verschiedenen Phospholipiden (z. B. PC, PS, SM, CH, mit 2,5–10 mg) ggf. unter Zusatz eines Detergents (Bsp. Triton X 100) gemischt, das Detergent wird durch Dialyse, Säulentrennung "Biobead"-Behandlung oder Zentrifugation entfernt und ggf. in Anwesenheit von 2 mM CaCl₂ werden die gewählten Genkonstrukte mit bzw. ohne vorherige Komplexierung durch Kernproteine (z. B. HMG-1) oder geeignete Kationen (z. B. Poly-L-Lysin) bzw. Oligonukleotide im Puffer zugesetzt.

Mit diesen Liposomensuspensionen inkubiert man dann in unterschiedlichen Zeit- und Konzentrationsprogrammen Glioblastomzellen, Lebertumorzellen, Nierenzellen usw. ¹⁰ in vitro bzw. wie in Bsp. 5 beschrieben in vivo (Bestimmung der Transfereffizienz).

8. Herstellung von Immunliposomen zum Gen- und Oligonukleotidtransfer

Zur Herstellung von Anti-CEA, Anti Thy 1.1, Anti-CD44, Anti-CD56 wurden modifizierte Antikörper an verschiedene Liposomentypen mit "Anker" gekoppelt.

Sie setzen sich aus an Phosphatidylethanolamin (PE) gekoppeltem Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)-butyrat (SMPB) zusammen. Über diese Anker werden mit Succinimidyl-S-acetylthioacetat (SATA)-modifizierte monoklonale Antikörper kovalent an die Liposomen gebunden. In einem Rundkolben vereinigt man 42,2 mg SMPB mit einer Lösung von 16,88 µl (118,16 µmol) Triethylamin in Methanol (5 ml, wasserfrei) und gibt nach vollständigem Auflösen der beiden Substanzen 88,62 mg in Chloroform gelöstes PE hinzu. Die Kopplungsreaktion findet durch Rühren des vor Tageslicht geschützten Ansatzes unter Stickstoffatmosphäre statt (3 h). Anschließend erfolgt eine DC-Kontrolle (Laufmittel: Chloroform: Methanol: Wasser = 65 : 25 : 4). Danach wird die Methanol/Chloroform-Phase am Rotationsverdampfer entfernt. Der entstandene gelbe Lipidfilm wird in 15 ml Chloroform gelöst und mit einer 0,9%igen Natriumchloridlösung (2 x, je 15 ml) extrahiert. Die Abtrennung der Phasen erfolgt durch Zentrifugation (23°C, 15 min., 5000 U/min.). Die obere Phase wird verworfen und die gesammelten restlichen Phasen mit Natriumsulfat getrocknet. Die Chloroformphase wird eingeengt, die Masse des Rückstandes bestimmt und ein DC angefertigt. Die säulenchromatographische Trennung des MPB-PE erfolgt durch Gradientenelution. Während der Immunliposomenpräparation werden in der Phase der Anker-Liposomenbildung die DNA- bzw. die Oligonukleotidkonstrukte in das Innere der Vesikel eingeschlossen. In anschließenden Gentransferexperimenten lässt sich die Transfereffizienz und die biologische Wirksamkeit nachweisen.

Patentansprüche

1. 38[N-(N,N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]cholesterol(DAC-Chol).
2. Verfahren zur Herstellung von DAC-Chol, dadurch gekennzeichnet, daß N,N'-Dimethylethylendiamin und Chlorformylcholesterol in äquimolaren Mengen miteinander umgesetzt werden und das erhaltene Produkt durch Chromatographie gereinigt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Reinigung säulenchromatographisch mit Silicagel und dem Fließmittel Trichlormethan/Methanol 9 : 1 und nachfolgend dünnenschichtchromatographisch mit dem Fließmittel Trichlormethan/Methanol 65 : 35 erfolgt.
4. Verwendung von DAC-Chol für den direkten liposomalen Gentransfer in vivo, ggf. unter Verwendung von Antikörpern, u. a. zur Herstellung von Immunliposomen, von viralen Fusionsproteinen und von Kernproteinen (Nichthistonproteinen) wie HMG-1.
5. Direkter liposomaler Gentransfer in vivo, dadurch gekennzeichnet, daß man Liposomen/DNA-Komplexe kontinuierlich bzw. in gezielten Zeitintervallen über automatische oder nachfüllbare Pumpsysteme wiederholt appliziert.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

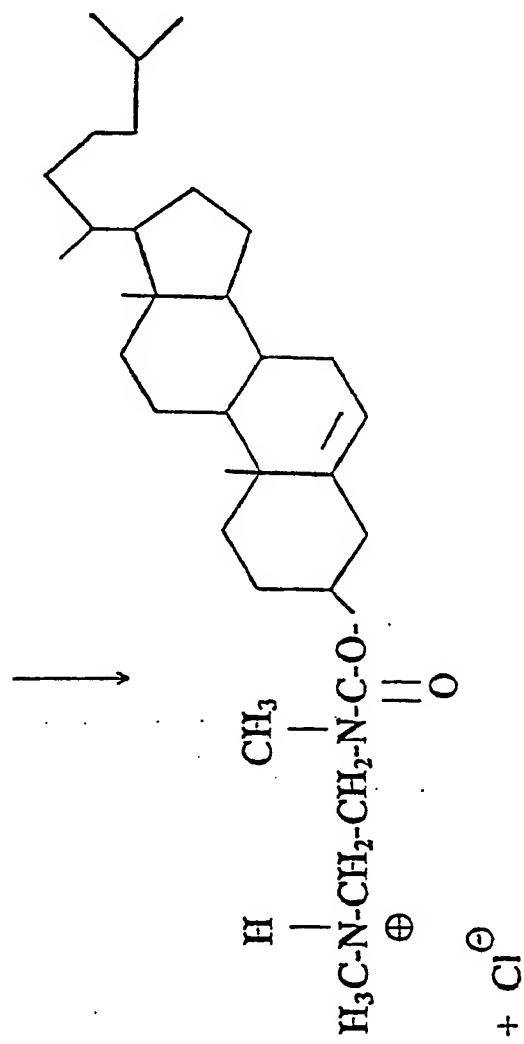
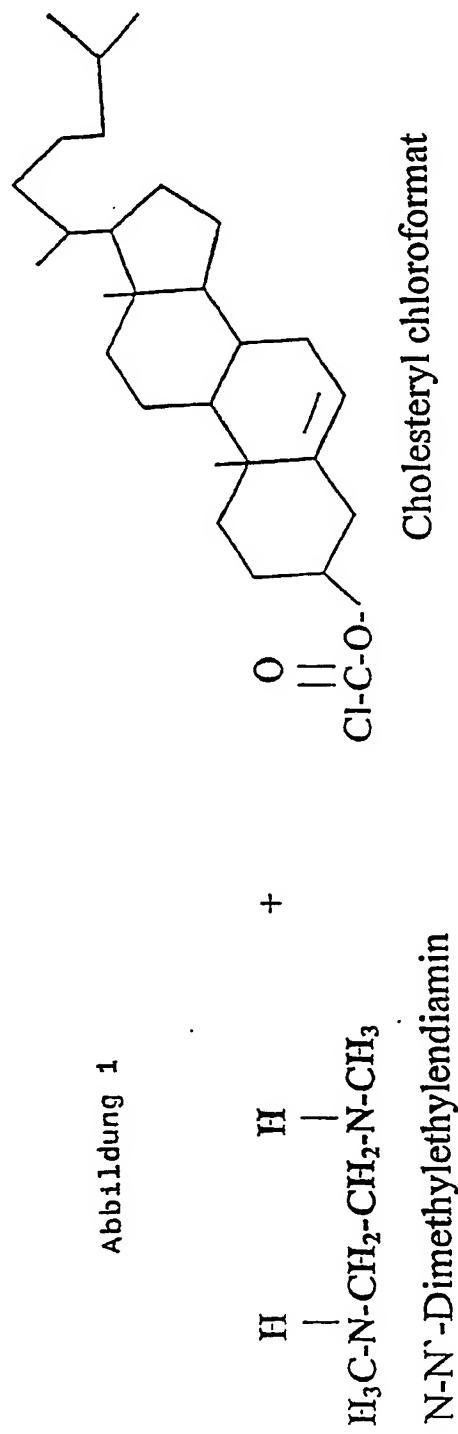
50

55

60

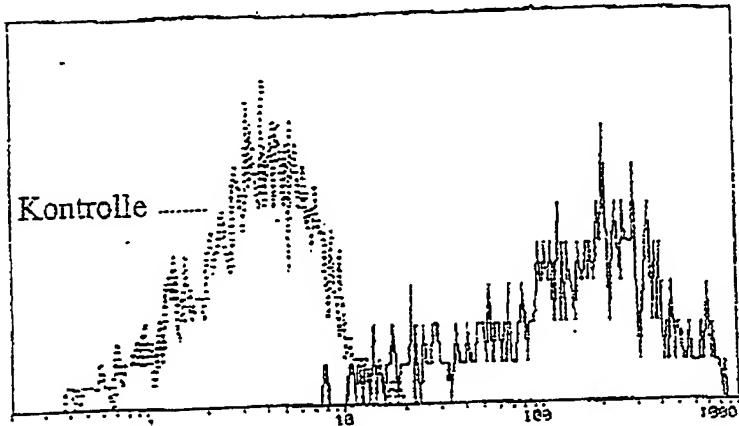
65

Abbildung 1

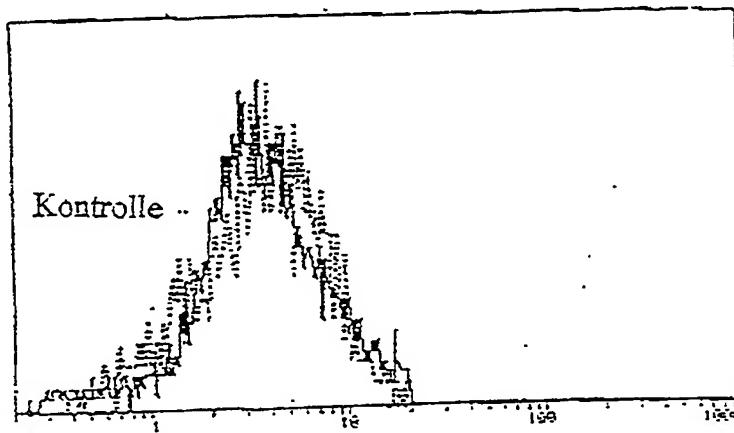


$3\beta[\text{N-N'-Dimethylethylenediaminocarbamoyl}] \text{cholesterol (DAC-Chol)}$

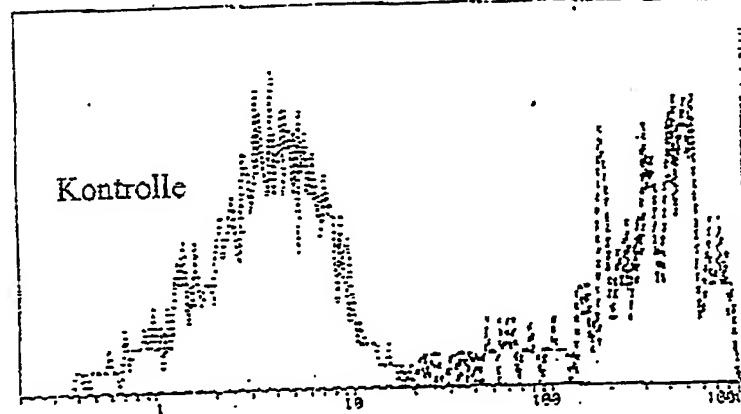
Zellzahl



Unbehandelt



Antisense Oligo.



Sense Oligo.

Fluoreszenzintensität

Durchflußzytometrische Messung des Effekts von CD44
Antisense Oligonukleotiden auf die Expression des
Adhäsionsmoleküls CD44 (U343 Zellen).

702 050/425

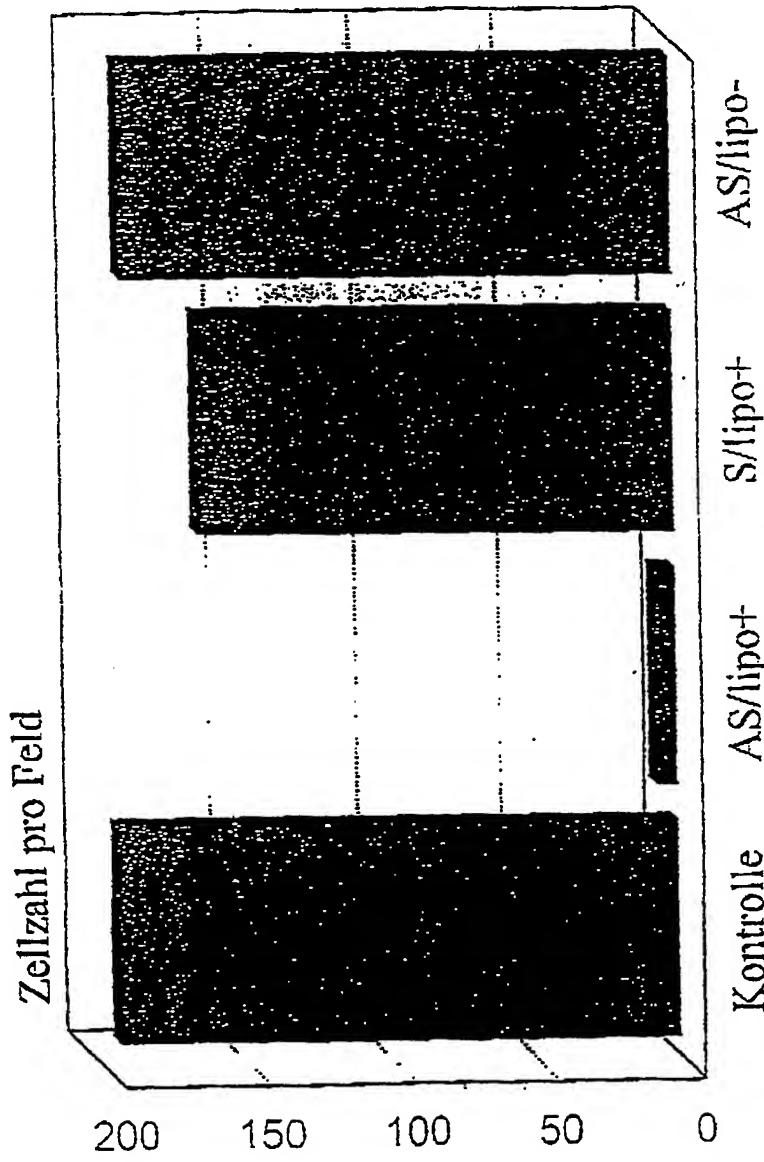
Abb.3

Expression von Adhäsionsmolekülen durch humane Glioblastomzelllinien

Zelllinien	Adhäsionsmoleküle			
	CD44	CD54	CD56	MHC-I
				MHC-II
A172	++	+	-	++
U343	++	++	-	++
U373	++	++	-	++
HS683	++	+	+	++
N28	++	+	+	++
N31	++	+	-	++
N39	++	+	-	++
N64	++	+	+	++
N65	++	+	-	-

Abb. 2

Effekt von CD44 Antisense auf das Invasionsverhalten von Glioblastomzellen



Hemmung der Invasion von U373 MG Zellen (humane Glioblastomzellen) in vitro durch CD44 Antisense Oligonukleotide. Die U373 MG Zellen werden zunächst mit 1 μ M Antisense Oligonukleotiden (AS) bzw. Sense Oligonukleotiden (S) nach Komplexierung mit 5 μ M Liposomen (kationische) 48h inkubiert. Anschließend gewinnt man die Zellen für den Invasionsassay.

Abb. 4